

09/763794

PCT/EP

99/06280

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 99/06280

REC'D 27 OCT 1999

WIPO PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

ETU

EPO - Munich
53

12 Okt. 1999

Bescheinigung

Das Klinikum der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg in Freiburg/Deutschland hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Herstellung von dendritischen Zellen mit nieder-
molekularen Fragmenten der Hyaluronsäure"

am 27. August 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
C 12 N 5/08 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 4. Oktober 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Joost

Aktenzeichen: 198 39 113.7

A 9161
06.90
11/98

48 (EODV-4)

LEDERER, KELLER & RIEDERER

Patentanwälte - European Patent Attorneys

DR. A. VAN DER WERTH
(1934 - 1974)

DR. FRANZ LEDERER
Dipl.-Chem. München

DR. GÜNTER KELLER
Dipl.-Biol. München

ANTON FREIHERR
RIEDERER v. PAAR
Dipl.-Ing. Landshut

80538 MÜNCHEN
Prinzregentenstraße 16
Telefon (089) 21 23 99 0
Telefax (089) 21 23 99 22
E-Mail lederer_keller@compuserve.com

27. August 1998

Klinikum der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Hugstetter Straße
79106 Freiburg

**Verfahren zur Herstellung von dendritischen Zellen mit
niedermolekularen Fragmenten der Hyaluronsäure**

Die Bereitstellung von dendritischen Zellen (DZ) erlangt bei der Therapie von verschiedenen Erkrankungen eine immer größer werdende Bedeutung. Mit Hilfe der dendritischen Zellen ist es möglich, hochaktive Immunmodulatoren bereitzustellen, die mit verschiedenen Antigenen, insbesondere Tumorantigenen, Viruspeptiden oder allergen wirkenden Verbindungen beladen werden können. Diese Zellen werden dann in der adoptiven Immuntherapie bei Patienten mit Tumoren, Viruserkrankungen oder Allergien eingesetzt. Es besteht daher in der adoptiven Immuntherapie ein erheblicher Bedarf an dendritischen Zellen, wobei diese dendritischen Zellen vorzugsweise über standardisierte, reproduzierbare und kostengünstige Verfahren bereitgestellt werden sollen. Diese Verfahren müssen unter GMP-/GLP-Bedingungen durchgeführt werden können.

Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Verfahren zur Erzeugung von dendritischen Zellen aus Stammzellen bekannt.

Aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut von mit Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) behandelten Chemotherapie-Patienten können hämatopoetische Stammzellen

isoliert werden, die den Oberflächenmarker CD34 aufweisen. Diese Stammzellen werden unter Zugabe verschiedener Zytokine kultiviert und die dendritischen Zellen werden nach einer verhältnismäßig langen Kultivierungszeit erhalten.

~~Bei einem anderen Verfahren werden Monozyten aus peripherem Blut isoliert, die mit GM-CSF und IL-4 kultiviert werden. Zur vollständigen Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen müssen am Ende der Differenzierungsphase weitere Zytokine zugesetzt werden.~~

Die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren weisen verschiedene Nachteile auf. Die verhältnismäßig lange Kultivierungsdauer ist für den Einsatz in der Klinik nicht geeignet. Darüber hinaus können die hohen Kosten der Zytokine und die Chargenabhängigkeit der eingesetzten Zytokine nachteilig sein.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Anreicherung von ausgereiften dendritischen Zellen, das folgende Schritte umfaßt:

- a) aus Blut werden mononukleäre Zellen gewonnen,
- b) Zellen, die den Oberflächenmarker CD14 aufweisen, werden angereichert,
- c) die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen werden in einem Medium kultiviert, das die Zytokine GM-CSF und IL-4 beinhaltet, und
- d) die in Schritt c) erhaltenen Zellen werden mit Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, kultiviert, um die Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen zu veranlassen.

Mononukleäre Zellen können aus Blut mit Hilfe eines Dichtegradienten gewonnen werden, wobei in bevorzugter Ausführungsform ein Leukozytenkonzentrat über einen Ficoll-Dichtegradienten aufgetrennt wird.

In dem zweiten Verfahrensschritt werden die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen angereichert, bevorzugt mit Hilfe von wenigstens einem gegen den Oberflächenmarker CD14 gerichteten Antikörper. Zum Einsatz kommen können hier die Magnet-aktivierte Zell-Sortierung (MACS) oder die Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS). Eine einfachere, jedoch nicht so effiziente Methode stellt die Anreicherung über Plastikadhäsion dar.

Anschließend werden die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen in einem Medium kultiviert, das GM-CSF in einer Konzentration von 5000 bis 10000 U/ml und IL-4 in einer Konzentration von 100 bis 1000 U/ml aufweist. Gegebenenfalls können noch weitere geeignete Zytokine zugesetzt werden.

Schließlich werden die in dem Kultivierungsschritt erhaltenen Zellen mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert, wobei diese Fragmente 1 bis 50 Grundbausteine der Hyaluronsäure aufweisen. Ein Grundbaustein stellt ein Aminodisaccharid aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin in β 1-3-glycosidischer Bindung dar. Bevorzugt eingesetzt werden Hyaluronsäurefragmente mit jeweils 1 bis 10 Grundbausteinen.

Die Kultivierung der den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen erfolgt in einem Medium, das GM-CSF und IL-4 enthält, bevorzugt für eine Dauer von wenigstens 72 h bis 7 Tagen. Hieran schließt sich die Kultivierung in Schritt d) für wenigstens 48 Stunden mit Hyaluronsäurefragmenten an. Die Hyaluronsäurefragmente liegen bevorzugt in einer Konzentration von 1 bis 50 μ g/ml und besonders bevorzugt in einer Konzentration von 10 bis 30 μ g/ml vor.

Die vorliegende Erfindung betrifft also die Verwendung von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten für die Ausreifung von dendritischen Zellen.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können dendritische Zellen hergestellt bzw. angereichert werden. Die dendritischen Zellen sind Antigen präsentierende Zellen, die auf die Initiation der primären Immunantwort spezialisiert sind. In den verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung übernehmen sie unterschiedliche Funktionen. In dem unreifen Zustand sind die dendritischen Zellen sehr effektiv beim Prozessieren von nativen Protein-Antigenen für den MHC Klasse II-Weg. Reife dendritische Zellen sind dagegen weniger für die Aufnahme von neuen Proteinen für die Präsentation geeignet, stimulieren aber dafür viel besser die ruhenden $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen hinsichtlich des Wachstums und der Differenzierung.

In vivo läuft die Reifung der dendritischen Zellen dann ab, wenn die unreifen dendritischen Zellen von den Stellen der Antigenaufnahme zu den T-Zell-Bereichen der lymphoiden Organe wandern. In vitro kann die Reifung in Kulturen von frisch isolierten dendritischen Zellen beobachtet werden. Die Reifung der dendritischen Zellen schlägt sich auch in Änderungen der Morphologie und des Phänotyps nieder. Die Charakterisierung und Differenzierung der dendritischen Zellen erfolgt üblicherweise über den Nachweis verschiedener Oberflächenmarker.

Aufgrund der natürlichen Funktionen sind die dendritischen Zellen besonders geeignet, als natürliches Adjuvans bei der Impfung und Immuntherapie, insbesondere bei der Tumorthherapie, eingesetzt zu werden. Dabei ist es für den angestrebten therapeutischen Einsatz entscheidend, ausgereifte DZ's zu verwenden, die sich nach Reinfusion in den Patienten nicht wieder zu Makrophagen-ähnlichen Vorstadien zurückdifferenzieren können.

Man geht nach derzeitigem Wissensstand davon aus, daß die dendritischen Zellen im unreifen Zustand das Antigen (beispielsweise ein Tumorantigen) aufnehmen und anschließend das Antigen prozessieren. Dabei reifen die dendritischen Zellen und wandern zu den T-Zell-reichen Bereichen der sekundären lymphoiden Organe. Reife dendritische Zellen exprimieren in hohem Maße MHC, co-stimulierende Moleküle und Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche, wodurch eine Interaktion zwischen den dendritischen Zellen und den T-Zellen ermöglicht wird (T-cell clustering). Co-stimulatorische Signale werden über B7-CD28 und CD40-CD40-Liganden-Interaktionen übertragen und durch die Produktion von Zytokinen, wie IFN- α , IFN- γ und IL-12, die bekannterweise die zellulär vermittelte Immunität fördern, verstärkt.

Nach derzeitigem Wissensstand scheint es wesentlich zu sein, daß für die Induktion von primärer T-Zellantwort spezialisierte Antigen präsentierende Zellen vorhanden sind, da die Präsentation von Antigenen an T-Zellen in Abwesenheit eines zweiten Signals (Co-Stimulation) entweder das Absterben der T-Zellen oder eine Antigen-spezifische Toleranz bewirken kann.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind daher insbesondere darin zu sehen, daß die dendritischen Zellen relativ einfach bereitgestellt werden können. Außerdem müssen nur verhältnismäßig geringe Konzentrationen an kostspieligen Zytokinen eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Bereitstellung einer Zellpopulation, die ganz überwiegend aus dendritischen Zellen besteht und, die sich in einem verhältnismäßig einheitlichen (synchronen) Reifungszustand befinden. Wenn die dendritischen Zellen für die Präsentation von Antigenen eingesetzt werden sollen, können die geeigneten Antigene zu einem geeigneten Zeitpunkt zu den dendritischen Zellen zugegeben werden und die Antigene können dann von den dendritischen Zellen im Laufe des Reifungsprozesses prozessiert werden. Die Antigene können

entweder als Proteine, in Form von abgetöteten Zellen oder Zellpräparationen oder auch in Form von gentechnologisch modifizierten Zellen zugegeben werden. Wenn sich die dendritischen Zellen in dem gewünschten Zustand befinden, können sie für die Therapie verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist für die Bereitstellung von autologen dendritischen Zellen geeignet. Der Begriff "autolog" bedeutet, daß die Ausgangszellen einem Spender (Patienten) entnommen werden. Diese Zellen werden dann in vitro erfindungsgemäß behandelt, um dendritische Zellen zu gewinnen. Die angereicherten dendritischen Zellen werden dann gegebenenfalls nach Kontakt mit dem Antigen demselben Spender, von dem sie ursprünglich herkommen, zurückgegeben.

Alternativ hierzu kann das Verfahren auch für die Bereitstellung von "allogenen" dendritischen Zellen verwendet werden. Hierbei werden die Zellen von einem Spender oder auch aus Blutkonserven, die von Blutspendediensten erhalten werden können, hergestellt und dann an andere Empfänger zurückgegeben. Hierdurch können standardisierte dendritische Zellen bereitgestellt werden, die beispielsweise optimal mit einem umorantigen beladen sind. Insbesondere bei viralen Infektionen (HIV) kann so die zelluläre Immunität effektiv gesteigert werden.

Erfindungsgemäß werden zur Ausreifung der dendritischen Zellen Fragmente von Hyaluronsäure (HA), die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, eingesetzt. Die Hyaluronsäure ist ein makromolekulares Polysaccharid, das als körpereigene Substanz vor allem in der Dermis zur Wasserspeicherung dient. Hyaluronsäure wird vor allem von Keratinozyten in den basalen Schichten der Oberhaut (Epidermis) sowie von Fibroblasten des Unterhaut-Bindegewebes produziert. Hyaluronsäure findet sich auch im Glaskörper von Augen, der Synovialflüssigkeit der Gelenke und ist ein Bestandteil des Bindegewebes. Bei niedrigen

Konzentrationen bildet Hyaluronsäure eine hochviskose wäßrige Lösung. Die Hyaluronsäure ist eine hochmolekulare Verbindung mit einem Molekulargewicht zwischen 50000 Dalton und mehreren Millionen Dalton. Der Grundbaustein der Hyaluronsäure ist ein Aminodisaccharid, das aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin in β 1-3-glycosidischer Bindung besteht. Dieser Grundbaustein ist mit der nächsten Einheit β 1-4-glycosidisch verbunden. Diese unverzweigte Kette der Hyaluronsäure besteht aus etwa 2000 bis 10000 derartiger Grundeinheiten. Durch Hyaluronidasen werden β -glucosidische Bindungen hydrolisiert und die Hyaluronsäure wird so zu kleineren Bruchstücken abgebaut. Erfindungsgemäß werden bevorzugt die Hyaluronidase aus Bullenhoden oder die aus Streptococcus hyalronicus isolierte Hyaluronidase verwendet. Die erfindungsgemäß eingesetzten Hyaluronsäurefragmente werden bevorzugt zunächst mechanisch durch Scherkraft und/oder Ultraschall zerkleinert und anschließend erfolgt ein weiterer Abbau des Polysaccharids mit Hilfe einer geeigneten Hyaluronidase. Die gewünschten Fragmente mit bevorzugt 1 bis 50 Grundeinheiten werden anschließend durch geeignete Trennverfahren isoliert.

Die Hyaluronsäurefragmente können vor oder nach der Isolierung geeignet chemisch modifiziert werden. Eine Modifizierung nach der Isolierung ist bevorzugt. Als Modifikationen können beispielsweise Veresterung, Salzbildung, Amidierung, Reduktion einer Säuregruppe zum Aldehyden oder Alkohol oder Abspaltung einer Säuregruppe genannt werden. Bevorzugt sind Salze und Ester der Hyaluronsäurefragmente, beispielsweise Alkali- und Erdalkalisalze und C_1 - C_{10} -, bevorzugt C_1 - C_4 -Alkylester. Auch andere chemische Modifikationen sind möglich und von einem Fachmann aufgrund seines Fachwissens ohne weiteres durchführbar.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgend beschriebenen Beispiele weiter erläutert. Bei der Durchführung

der Beispiele wurde besonders auf Verunreinigungen der Reagenzien mit Lipopolysacchariden (LPS) geachtet. Lipopolysaccharide sind Bestandteile aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien. Schon kleinste Verunreinigungen mit Lipopolysacchariden reichen aus, um Monozyten bzw. $CD14^{+}$ -Stammzellen des peripheren Blutes irreversibel zu aktivieren. Daher wurde bei den erfindungsgemäß durchgeführten Versuchen darauf geachtet, einen Schwellenwert von 0,01 ng/ml Lipopolysaccharid zu unterschreiten, der erfahrungsgemäß keinen Einfluß auf Monozyten, $CD14^{+}$ Stammzellen oder dendritische Zellen hat.

Beispiel 1: Zellisolation

a) Gewinnung von mononukleären Zellen (PBMC)

Ein Leukozytenkonzentrat (Buffy coat) von einem gesunden, humanen Spender wurde über einem Dichtegradienten mit Ficoll-Hyperpaque plus (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durch Zentrifugation aufgetrennt. Die mononukleären Zellen (PBMC) lagern sich dabei in der Interphase des Gradienten ab, rote Blutkörperchen (Erythrozyten) sowie neutrophile Granulozyten befinden sich unter dem Gradienten und wurden verworfen. Ficoll-Hyperpaque plus ist ein Gemisch von makromolaren Zuckern zellulärer Herkunft, ist aber vom Hersteller auf den LPS-Gehalt getestet (Endotoxin-Gehalt $>0,001$ ng/ml). Dieser Wert konnte in eigenen Tests bestätigt werden.

b) Markierung der $CD14$ -positiven Zellen

Zur weiteren Aufreinigung der Monozyten wurden die PBMC für 45 min. mit anti- $CD 14$ -mAK inkubiert. Daraufhin wurde mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert. MACS® (Miltenyi, Biotech, Bergisch Gladbach) = Magnetic activated Cell sorting; Eine Methode zur Aufreinigung von Zellen über an Metallkügelchen gebundene Antikörper; Markierte

Zellen bleiben in der magnetischen Säulenmatrix hängen. [PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Gibco) mit 5 mM Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) und Rinder-Serumalbumin (BSA); pH 7,2 durch Zugabe von HCl eingestellt]. Durch Zugabe von EDTA wird das Klumpen der Zellen verhindert, was wichtig für die Aufreinigung in der Säule ist. Nun wurden die Zellen mit 50 μl Ziege-anti-Maus-IgG Microbeads unter den gleichen Bedingungen inkubiert, anschließend mit MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert.

c) Anreicherung der CD14-positiven Zellen über MACS

Die Anreicherung erfolgte bei 4°C. Die VS+®Säule wurde in den MACS-Magneten (beides Miltenyi) eingesetzt und zunächst mit 5 ml MACS-Puffer gewaschen. Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension wurden die Zellen durch ein Zellsieb (30 μm Maschenweite; Miltenyi) passiert und auf die Säule aufgetragen. Die Negativfraktion aus unmarkierten Zellen, die magnetisch nicht in der Säulenmatrix festgehalten wurden, liefen durch und wurden verworfen. Die Säule wurde noch zweimal mit jeweils 5 ml MACS-Puffer gewaschen, um eine möglichst reine CD14-positivfraktion zu erhalten. Anschließend wurde die Säule aus den Magneten genommen und die spezifisch über Microbeads in der Matrix festgehaltenen Zellen unter Druck mit 5 ml Puffer in ein steriles Röhrchen gespült. Die erhaltenen Zellen wurden in der Neubauerkammer ausgezählt. In der Regel konnten durch diese Methode aus einem Buffy-coat $3-5 \times 10^7$ CD14-positive Zellen (Monozyten) gewonnen werden, mit einer Reinheit >90 %. Diese Zellen lassen sich vollständig durch Zytokinzugabe in DZ umwandeln.

Beispiel 2: Zellkultur

Die isolierten CD14-positiven Zellen wurden in 12 ml c-RPMI [(cRPMI: "RPMI 1640" (Gibco, Paisley, Schottland) mit 10 % Hitze-inaktiviertem fötalen Kälberserum, 1 % L-Glutamin und 1 %

Penicillin-Streptomycin), alle Bestandteile enthalten weniger als 0,025 internationale Endotoxineinheiten/ml (Richtwert für Aqua ad injectabilia)] aufgenommen. Um sie zu dendritischen Zellen (DCs) ausreifen zu lassen, wurde ihnen humanes GM-CSF für die klinische Anwendung (Leukomax 400®, Sandoz AG, Nürnberg) in einer Konzentration von 8000 Einheiten/ml Medium und IL-4 (Genzyme, Rüsselsheim, Charge auf LPS-Gehalt getestet: <0,001 ng/ml) in einer Konzentration von 500 Einheiten/ml Medium zugegeben. Dann wurde die Zellsuspension in einer 6-Well-Platte zu jeweils 2 ml auspipettiert und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Am vierten Tag wurden nochmals 2 ml/well c-RPMI mit GM-CSF und IL-4 dazugegeben.

Beispiel 3: Hyaluronsäurepräparationen

a) Fraktionierung von Hyaluronsäure und Auftrennung der Fragmente

Aufgereinigte Hyaluronsäure (HA) aus Hahnenkämmen (Healon®; Pharmacia, für den klinischen Einsatz bestimmt, Endotoxin-gehalt >0,001 ng/mg) wurde zunächst mit einem Ultraschallgerät (Branson Sonifier) für 2 min. in größere Bruchstücke gespalten. Um diese Bruchstücke weiter zu zerkleinern, wurde ihnen Hyaluronidase (Typ I aus Rinderhoden; Sigma) zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde mit Natriumacetat auf pH 5 eingestellt, bei 37°C für 12 Std. inkubiert und anschließend durch Erhitzen auf 90°C inaktiviert. Die erhaltenen Fragmente wurden nun nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurden sie in einer 1,5 m langen Glassäule auf ein Polyacrylamidgel (Bio-Gel P-10, Bio-Rad, München) geschichtet. Als Spülflüssigkeit diente Aqua bidestillata, unter der Säule nahm ein Fraktionssammler (Pharmacia) alle 20 min. die Fraktionen auf. Die Röhrchen wurden verschlossen, kühl und lichtgeschützt gelagert.

b) Detektion der Größe der Hyaluronsäurefragmente

1. *größere Bruchstücke nach Ultraschallzerkleinerung*

Sonifizierte HA wurde in einem 5 %igen Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Polysaccharidbanden wurden im Gel durch Färbung mit Stains-all (3,3'-Diethyl-9-methyl-4,5,4',5'-dibenzothiacarbo-cyanin; Sigma) sichtbar gemacht. Die so erhaltenen Fragmente haben eine Größe von 10.000 bis 50.000 kDa.

2. *kleine Fragmente nach zusätzlicher Hyaluronidaseverdauung*

ANTS-Markierung:

Zunächst mußten die einzelnen Proben mit dem Fluorophor ANTS markiert werden [ANTS-Lösung: 0,15 M 8-Aminonaphtalen-1,3,6-Trisulfonsäure Dinatriumsalz in Essigsäure/Wasser (3/17, v/v), durch langsames Erhitzen auf 60°C gelöst]. ANTS markiert jedes Zuckermolekül am Kettenende. Die kleinen Fragmente wurden ebenfalls mittels Gelelektrophorese unter Verwendung eines 30 % Acrylamidgels aufgetrennt. Das Gel konnte nun unter UV-Licht (ANTS-Farbstoff) sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden.

c) Quantitative Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration nach der Fragmentierung und Auftrennung

Es wurden von jeder Probe 0,1 ml abgenommen und im Eisbad mit 0,6 ml Färbelösung (5,2 g di-Natrium-Tetraborat in 1 l konzentrierter Schwefelsäure) gemischt. Nun wurden jeweils 0,02 ml 0,1 % Carbazol in Ethanol zugegeben, gemischt und abermals 10 min. lang gekocht. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur konnte die HA-Konzentration photometrisch bei 520 nm bestimmt werden. Als Leerwert diente Aqua dest., als Standard 0,2 µM HA/ml in Aqua dest.

Beispiel 4: Zellstimulation

Zur Stimulation wurden den Zellen am vierten Tag der Kultivierung unterschiedliche HA-Fragmente in einer Konzentration von 0,025 mg/ml (25 µg/ml) Medium zugesetzt. Als Positivkontrolle dienten Lipopolysaccharide (LPS) von Escherichia coli Serotyp 0177 (Sigma).

Ergebnisse:

1) Auftrennung der erhaltenen Fragmente mittels Gelelektrophorese und ANTES-Färbung. Die erfindungsgemäß verwendeten Fragmente weisen eine Größe von 2 bis hin zu 12-fach-Zuckern auf. Die Konzentrationsmessung ergab Werte von etwa 1 mg/ml gespaltene HA. Eine weitere Aufspaltung dieser Fraktion in einzelne Zucker ist prinzipiell mittels einer HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) möglich. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß besonders die kleinen Fragmente für die Stimulation verantwortlich sind.

2) Einfluß der DC-Stimulierung mittels HA-Fragmenten auf die Expression von Oberflächenmarkern.

Über die FACS Abbildungen kann die Oberflächendichte verschiedener Rezeptoren mittels Antikörper festgestellt werden. Integriert man die Fläche unter den Kurven, erhält man die sogenannte MFI (Mean fluorescence intensity). Diese Werte sind in der Tabelle 1 für verschiedene Rezeptoren aufgelistet.

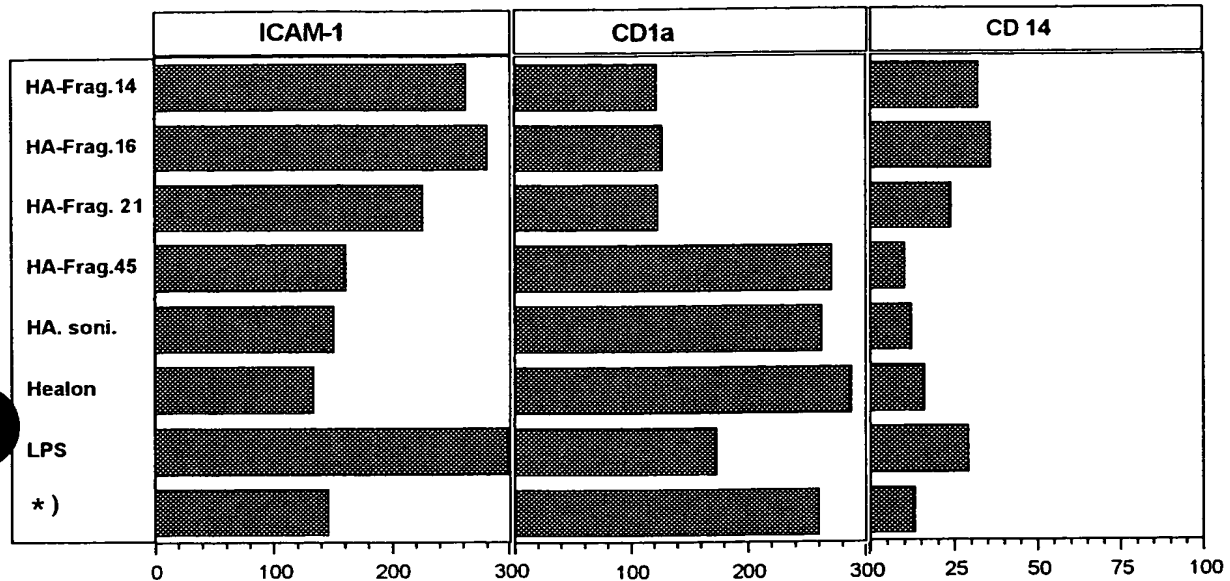
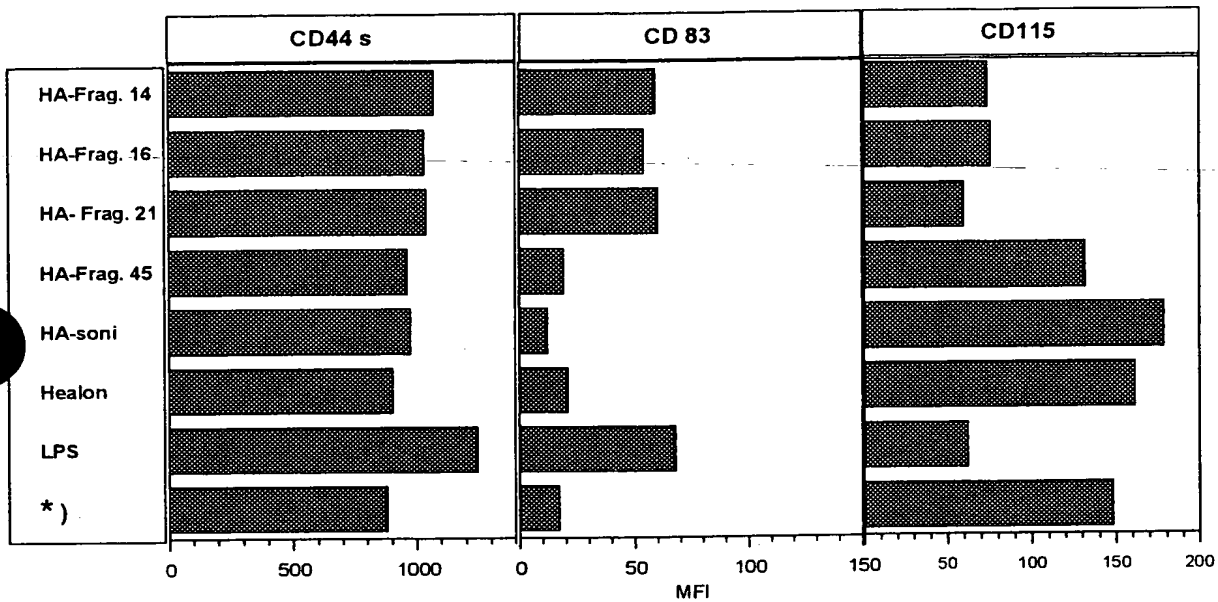


Tabelle 1 *) unbehandelte unreife DZ's, Tag 4

Zur Bedeutung der einzelnen, in Tabelle 1 aufgeführten Oberflächenmarker:

ICAM-1 ist ein fast ubiquitär vorkommendes InterCelluläres AdhäsionsMolekül. Die Ergebnisse zeigen eine leichte Aufregulation, wie sie bei verschiedensten Arten der Zellaktivierung beobachtet wird. CD1a ist ein Marker für dendritische und Langerhanszellen der Haut; während Monozyten ausschließlich CD14 exprimieren, kommt es im Laufe der Ausreifung immer mehr zum Verlust von CD14 und Expression von CD1a. LPS, HA-Fragmente und MCM-Medium drängen diesen Prozeß wieder leicht zurück, funktionelle Konsequenzen dieser Regulation sind aber nicht bekannt.

Tabelle 2:

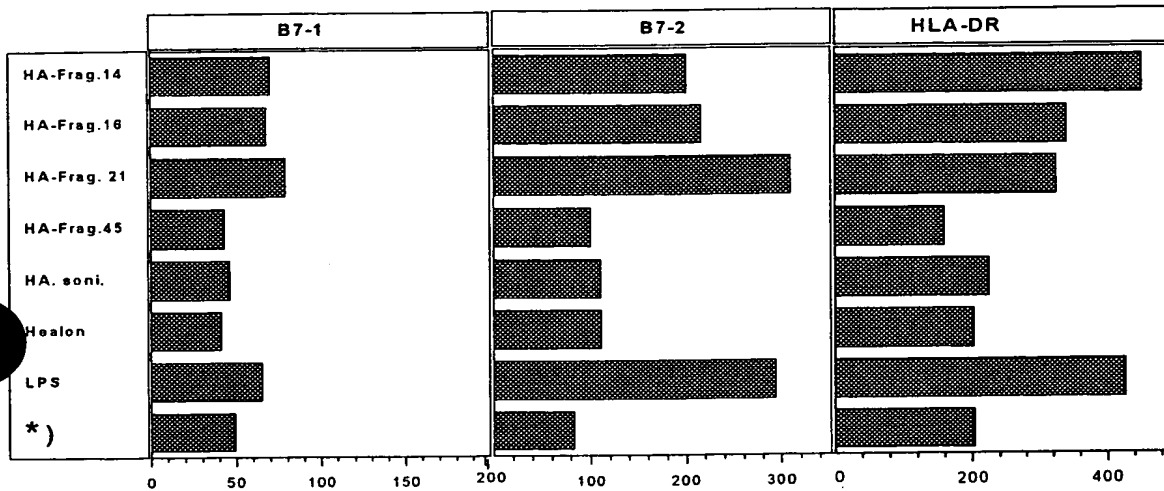


*) unbehandelte unreife DZ's, Tag 4

Tabelle 2 zeigt die Stimulierung anderer Oberflächenmarker (CD44s, CD83 und CD115). Weiteres Anzeichen der DZ-Ausreifung sind eine Herunterregulation von CD115 (dem G-CSF Rezeptor) sowie eine Aufregulation von CD83, eine funktionelle Relevanz dieser Veränderungen ist noch nicht bekannt. In der Tabelle 2 ist deutlich zu sehen, daß die Kriterien der DZ-Ausreifung durch Stimulation mit kleinen HA-Fragmenten voll erfüllt werden.

CD44 ist ein Adhäsionsmolekül, eine beschriebene Funktion ist die Bindung von HA.

Tabelle 3



*) unbehandelte unreife DZ's, Tag 4

Tabelle 3 zeigt die Expression von weiteren Oberflächenmarkern.

Neben den Reifungsmarkern sind hier Faktoren dargestellt, die für die Funktion der Antigen-Präsentation, d.h. der Stimulation von T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle spielen. Hierzu zählen das MHC Klasse II Molekül HLA-DR sowie die beiden kostimulatorischen Faktoren B7-1 und B7-2. Ohne die Aufregulation dieser Faktoren ist auch ein Einsatz der DZ in den oben beschriebenen Anwendungen nicht sinnvoll. Erfindungsgemäß wurde eine deutliche Aufregulation aller Faktoren nach Behandlung mit HA-Fragmenten gefunden, vergleichbar mit der maximalen Stimulation nach LPS-Gabe.

Beispiel 5

Um die vermehrte Expression von Oberflächenmolekülen funktionell darzustellen, wurden die DZ vorstimuliert und für 5 Tage mit aufgereinigten naiven allogenen T-Zellen inkubiert, die ebenfalls aus Leukozytenkonzentrat (buffy coats) gewonnen wurden (sog. mixed leukocyte reaction, MLR). Je nach

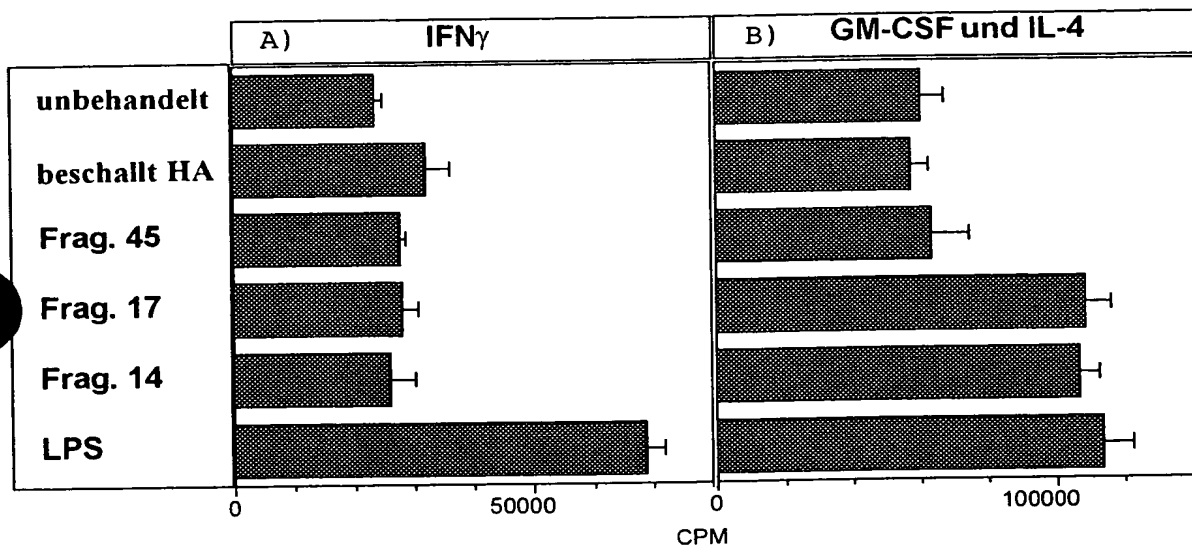
stimulatorischer Kapazität der DZ's kommt es dabei zu mehr oder weniger ausgeprägter T-Zellproliferation, die mittels Einbau von radioaktiven ^3H -Thymidin bestimmt wurde. Es wurden die radioaktiven Counts per minute (Cpm) der einzelnen Proben dargestellt, die direkt mit der stattgefundenen T-Zellproliferation korrelieren. Man sieht, daß DZ's, die mit kleinen HA-Fragmenten behandelt wurden, deutlich potentere APC's sind, vergleichbar mit dem für LPS-Stimulation erhaltenen Wert (dargestellt in Tabelle 4 B).

Auch dieses Beispiel belegt, daß erfindungsgemäß mit kleinen HA-Fragmenten zwischen 2-12 UDP-Zuckermolekülen eine deutliche Ausreifung von DC erhalten wird, die durchaus vergleichbar ist mit publizierten Daten anderer Methoden. Eine strenge Abhängigkeit von einem einzelnen Zucker erscheint unwahrscheinlich, jedoch haben größere Moleküle (20-30 UDP-Zucker) offensichtlich keinen Einfluß, da die erfindungsgemäß eingesetzten Fraktionen keine Unterschiede in der Wirkung zeigen, auch wenn sie größere Fragmente enthalten. Geschallte HA hat ebenfalls keinen Effekt.

Beispiel 6

Interessanterweise ist der erfindungsgemäße Effekt offensichtlich spezifisch für DZ's, da mit Interferon-gamma ($\text{IFN}\gamma$) behandelte Monozyten, die zu Makrophagen ausreifen, keine Steigerung ihrer stimulatorischen Kapazität nach Behandlung mit HA-Fragmenten zeigen (siehe Tabelle 4 A).

Tabelle 4



Frag. 45: In der Gelelektrophorese kein Nachweis von kleinen HA-Fragmenten, im Uronsäure-Assay weniger als 0,001 mg HA = Negativfraktion zum Ausschluß einer Wirkung von Säulenbestandteilen.

Frag. 17: In der Gelelektrophorese liegen die größten nachweisbaren Banden bei ca. 16-fach Zuckern, stark vertreten sind Zucker bis zu einer Größe von 6-fach Zucker. Uronsäure-Assay: 1 mg/ml.

Frag. 14: Gelelektrophorese: bis ca. 22-fach Zucker, starke Banden bis 10-fach Zucker, Uronsäure-Assay: 1 mg/ml.

Klinikum der Albert-Ludwigs-
Universität Freiburg

Patentansprüche

1) Verfahren zur Anreicherung von dendritischen Zellen, das folgende Schritte umfaßt:

- a) aus Blut werden mononucleäre Zellen gewonnen,
- b) Zellen, die den Oberflächenmarker CD14 aufweisen, werden angereichert,
- c) die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen werden in einem Medium kultiviert, das die Zytokine GM-CSF und IL-4 beinhaltet, und
- d) die in Schritt c) erhaltenen Zellen werden mit Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, kultiviert, um die irreversible Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen zu veranlassen.

2) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die mononucleären Zellen aus Blut mit Hilfe eines Dichtegradienten, insbesondere eines Ficoll-Dichtegradienten aus einem Leukozytenkonzentrat gewonnen werden.

3) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen mit Hilfe wenigstens eines gegen den Oberflächenmarker CD14 gerichteten Antikörper angereichert werden.

4) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen in einem Medium kultiviert werden, das GM-CSF in einer

Konzentration von 5000 bis 10000 U/ml und IL-4 in einer Konzentration von 100 bis 1000 U/ml aufweist.

5) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in Schritt d) mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert werden, die 1 bis 50 Grundbausteine der Hyaluronsäure aufweisen, wobei der Grundbaustein ein Aminodisaccharid aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin in β 1-3-glykosidischer Bindung ist.

6) Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Hyaluronsäurefragmente jeweils 1 bis 10 Aminodisaccharide aufweisen.

7) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen zwischen 72 Stunden und 7 Tagen in einem Medium kultiviert werden, das GM-CSF und IL-4 enthält.

8) Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in Schritt d) für wenigstens 8 Stunden mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert werden.

9) Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß chemisch modifizierte Hyaluronsäurefragmente eingesetzt werden.

10) Verwendung von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet chemisch modifiziert sein können, für die Anreicherung von dendritischen Zellen.

Klinikum der Albert-Ludwigs-
Universität Freiburg

Zusammenfassung

Offenbart wird ein Verfahren zur Anreicherung von dendritischen Zellen, das folgende Schritte umfaßt:

- a) aus Blut werden mononucleäre Zellen gewonnen,
- b) Zellen, die den Oberflächenmarker CD14 aufweisen, werden angereichert,
- c) die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen werden in einem Medium kultiviert, das die Zytokine GM-CSF und IL-4 beinhaltet, und
- d) die in Schritt c) erhaltenen Zellen werden mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert, um die irreversible Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen zu veranlassen.

